

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง
 - 1.1 หนอนเชื้อไฟ จากป่าไฟ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่
 - 1.2 กระต่ายสายพันธุ์ Japanese white rabbit ตัวผู้ 2 ตัวและตัวเมีย 2 ตัว
2. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง
 - 2.1 กรงพลาสติก พร้อมฝาปิดเจาะรู
 - 2.2 กระดาษชำระชุบน้ำพอมacad
 - 2.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการหยดฮอร์โมน
 - 3.1 ฮอร์โมนจูวีไนล์ (JHA, S-methoprene)
 - 3.2 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มหยดฮอร์โมนขนาดเล็ก (microsyringe)
 - 3.3 กระดาษชำระ
4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บฮีโมลิมพ์
 - 4.1 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)
 - 4.2 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)
 - 4.3 เครื่องผสมเขย่า (vortex mixture)
 - 4.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
 - 4.5 ไมโครปิเปต
 - 4.6 กรรไกรปลายแหลม
 - 4.7 ปากคีบขนาดเล็ก

- 4.8 เข็มปักแมลง เบอร์ 3
 - 4.9 ถาดผ่าตัดขนาดเล็ก
 - 4.10 สำลี
 - 4.11 แอลกอฮอล์
 - 4.12 แผ่น parafilm
 - 4.13 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก (microtube)
 - 4.14 70% ammonium sulfate
 - 4.15 ฟีนิล ไธโอยูเรีย (phenylthiourea)
 - 4.16 สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution)
 - 4.17 2X sample buffer
 - 4.18 ไดเอทิลอีเธอร์ (diethyl ether)
 - 4.19 น้ำแข็ง
5. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์โปรตีน
 - 5.1 Q-sepharose FF column chromatography
 - 5.2 O-sepharose HP column chromatography
 - 5.3 Superose 6 FPLC column chromatography (Gel filtration chromatography)
 - 5.4 Mono Q column chromatography
 - 5.5 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
 - 5.6 magnetic stirrer
 - 5.7 เครื่องปั๊มอาศัยแรงดัน (pressure pump)
 - 5.8 UV monitor
 - 5.9 เครื่องบันทึกข้อมูล (recorder)
 - 5.10 เครื่องเก็บตัวอย่าง (fraction collector)
 - 5.11 ขวดเก็บสารละลาย
 - 5.12 ถุงเซลโลเฟน (cellophane)
 - 5.13 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
 - 5.14 หลอด ultracentrifuge
 - 5.15 เข็มฉีดยา

- 5.16 บีกเกอร์
 - 5.17 30mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 5.18 30mM Tris-HCl, pH 7.5 +1 M NaCl
 - 5.19 30mM Tris-HCl, pH 7.5 + 0.2 M NaCl
 - 5.20 1 mM Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)
 - 5.21 อะซิโตน (acetone)
6. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ เอสดีเอส (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)
- 6.1 ชุดสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิสขนาดเล็ก (minigel electrophoresis) ประกอบด้วย แผ่นแก้ว (ขนาด 10.5x10.0 เซนติเมตร), spacer, comb และ chamber
 - 6.2 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
 - 6.3 บีกเกอร์
 - 6.4 ไมโครปิเปต
 - 6.5 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
 - 6.6 โปรตีนมาตรฐาน (protein marker)
 - 6.7 30% อะคริลาไมด์ (acrylamide)
 - 6.8 0.75 M Tris-HCl, pH 8.8
 - 6.9 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8
 - 6.10 10% SDS
 - 6.11 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
 - 6.12 25% ammonium persulfate
 - 6.13 2x sample buffer
 - 6.14 electrophoresis buffer
7. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการย้อมสี SDS-PAGE
- 7.1 ย้อมโดยใช้สีย้อม CBB (0.025% Coomassie Brilliant Blue R-250)
 - 7.1.1 ถังล้างพลาสติกมีฝาปิด
 - 7.1.2 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ (shaker)

- 7.1.3 สีย้อม Coomassie Brilliant Blue (CBB)
- 7.1.4 เมทานอล (methanol)
- 7.1.5 กรดอะซิติก (acetic acid)
- 7.1.6 น้ำกลั่น
- 7.2 ย้อมโดยใช้ Silver Stain Plus
 - 7.2.1 ถังพลาสติก
 - 7.2.2 กระบอกตวง
 - 7.2.3 ไมโครปิเปต
 - 7.2.4 Silver Stain Plus Kit ประกอบด้วย developmental accelerator solution, silver complex solution, reduction moderator solution, image development reagent และ fixative enhancer solution
 - 7.2.5 เมทานอล
 - 7.2.6 กรดอะซิติก
 - 7.2.7 น้ำกลั่น
- 8. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน
 - 8.1 เครื่องผสมเขย่า
 - 8.2 spectrophotometer
 - 8.3 microcuvettes
 - 8.4 ไมโครปิเปต
 - 8.5 กระดาษกรอง
 - 8.6 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
 - 8.7 ขวดรูปชมพู่ (flask)
 - 8.8 กรวยกรอง
 - 8.9 bovine serum albumin
 - 8.10 Bio-Rad Protein Assay Kit
 - 8.11 น้ำกลั่น

9. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

- 9.1 Gel-filtration chromatography (superose 6)
- 9.2 หลอด ultracentrifuge
- 9.3 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 9.4 เครื่องปั๊มอาศัยแรงดัน
- 9.5 UV monitor
- 9.6 เครื่องบันทึกข้อมูล
- 9.7 เครื่องเก็บตัวอย่าง
- 9.8 ขวดเก็บสารละลาย
- 9.9 microcuvettes
- 9.10 spectrophotometer
- 9.11 ไมโครปิเปต
- 9.12 30 mM Tris-HCl, pH 7.5 + 0.2 M NaCl
- 9.13 โปรตีนมาตรฐาน
- 9.14 น้ำกลั่น

10. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน

- 10.1 Protein Sequencer Applied Biosystem Model 476A
- 10.2 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ
- 10.3 ชุดสำหรับทำอิเล็กโตรโฟเรซิส
- 10.4 ชุดเครื่องมือ Western blot
- 10.5 หลอด ultracentrifuge
- 10.6 evaporator
- 10.7 ไมโครปิเปต
- 10.8 PVDF membrane (Polyvinylidene difluoride microporous membrane)
- 10.9 กระดาษกรอง
- 10.10 ใบมีดโกน
- 10.11 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 10.12 เมทานอล

- 10.13 blotting buffer
 - 10.14 สีย้อม CBB (Coomassie Brilliant Blue)
 - 10.15 destain solution
 - 10.16 C-18 HPLC (High-performance liquid chromatography)
 - 10.17 *Staphylococcus aureus* protease 8
 - 10.18 1.5 M bromocyanide (BrCN)
 - 10.19 trypsin
 - 10.20 denatured storage protein
 - 10.21 70% formic acid
 - 10.22 10% acetonitrile
 - 10.23 10% TFA (Trifluoroacetic acid)
 - 10.24 electrophoresis buffer
 - 10.25 โปรตีนมาตรฐาน (standard protein)
 - 10.26 sample buffer
11. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสร้างแอนติบอดี
- 11.1 ชุดสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
 - 11.2 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ
 - 11.3 เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
 - 11.4 หลอด ultracentrifuge
 - 11.5 ถังพลาสติก
 - 11.6 ไมโครปิเปต
 - 11.7 กระบอกฉีดยาพร้อมหัวเข็ม
 - 11.8 ชุดอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างเลือด ประกอบด้วย สายยาง, เข็มฉีดยา, หัวหนีบ และ หลอดแก้วขนาดใหญ่
 - 11.9 เข็มฉีดยา หมายเลข 18 และ 26
 - 11.10 ใบมีดโกน
 - 11.11 แผ่น parafilm
 - 11.12 ถุงมือยาง

- 11.13 30 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 11.14 Freund's complete adjuvant
 - 11.15 Freund's incomplete adjuvant
 - 11.16 สำลี
 - 11.17 แอลกอฮอล์
 - 11.18 ลีซ้อม CBB
 - 11.19 electrophoresis buffer
 - 11.20 น้ำกลั่น
 - 11.21 น้ำแข็ง
12. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ Western blot analysis
- 12.1 ชุดสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิสขนาดเล็ก
 - 12.2 Western blotter
 - 12.3 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
 - 12.4 บีกเกอร์
 - 12.5 ไมโครปิเปต
 - 12.6 PVDF membrane
 - 12.7 กระดาษกรอง
 - 12.8 ถ้วยพลาสติก
 - 12.9 โปรตีนมาตรฐาน
 - 12.10 30% อะครีลาไมด์
 - 12.11 0.75 M Tris-HCl, pH 7.5
 - 12.12 0.25 M Tris-HCl, pH 6.5
 - 12.13 10% SDS
 - 12.14 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
 - 12.15 5% ammonium persulfate
 - 12.16 3% skim milk
 - 12.17 Tween-20
 - 12.18 anti-SP1 rabbit polyclonal antibody

- 12.19 anti-SP2 rabbit polyclonal antibody
- 12.20 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG
- 12.21 PBS (phosphate buffer saline, pH 7.4)
- 12.22 50 mM Tris buffer, pH 7.5
- 12.23 30% H₂O₂ (hydrogen peroxide)
- 12.24 DAB tablets (3,3'-Diaminobenzidine)
- 12.25 sample buffer
- 12.26 blotting buffer

13. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำ Immunohistochemistry

- 13.1 ตู้อบ (hot oven)
- 13.2 กระดาษไลต์
- 13.3 เครื่อง microtome
- 13.4 หลอดหยด
- 13.5 ตะเกียงเบนเสน
- 13.6 ถาดผ่าตัดขนาดเล็ก
- 13.7 กรรไกรขนาดเล็ก
- 13.8 คีมคีบปลายแหลม
- 13.9 เข็มปักแมลง
- 13.10 หลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 13.11 ไมโครปิเปต
- 13.12 ถ้วยพลาสติก
- 13.13 กระดาษชำระ
- 13.14 Ringer's solution
- 13.15 Bouin's fixative
- 13.16 เอธานอล
- 13.17 xylene
- 13.18 พาราพลาสติก (paraplast)
- 13.19 anti-SP1 rabbit polyclonal antibody

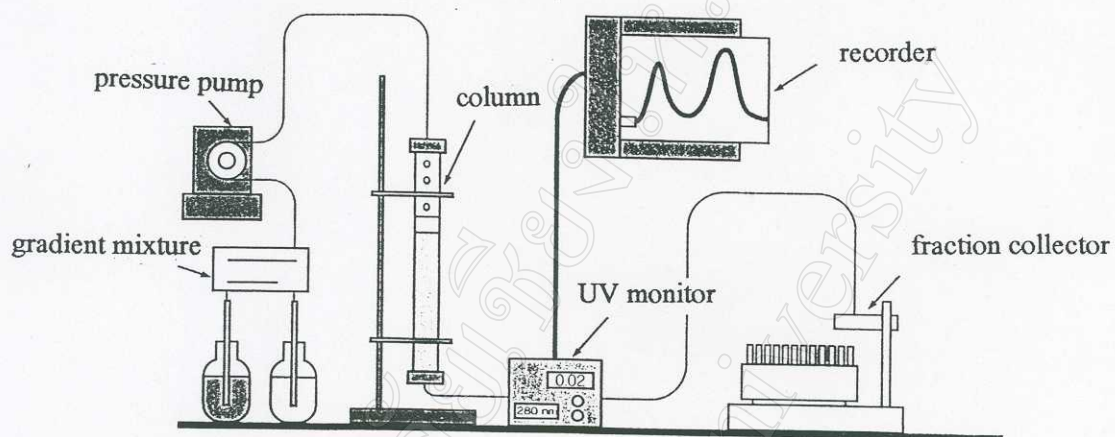
- 13.20 anti-SP2 rabbit polyclonal antibody
- 13.21 HRP conjugated goat anti-rabbit IgG
- 13.22 DAB tablets
- 13.23 50 mM Tris buffer, pH 7.5
- 13.24 เมทิลซาลิไซเลต (methyl salicylate)
- 13.25 น้ำกลั่น

14. อุปกรณ์ในการบันทึกผล

- 14.1 กล้องถ่ายรูป
- 14.2 กล้องจุลทรรศน์
- 14.3 เครื่อง scanner

15. สถานที่ทำการวิจัย

- 15.1 ห้องปฏิบัติการต่อมไร้ท่อวิทยา (Endocrinology) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- 15.2 ห้องปฏิบัติการชีววิทยาของการเจริญ (Developmental Biology) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยคานาฮาวา ประเทศญี่ปุ่น



ภาพ 2 แสดงชุดอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกบริสุทธิ์



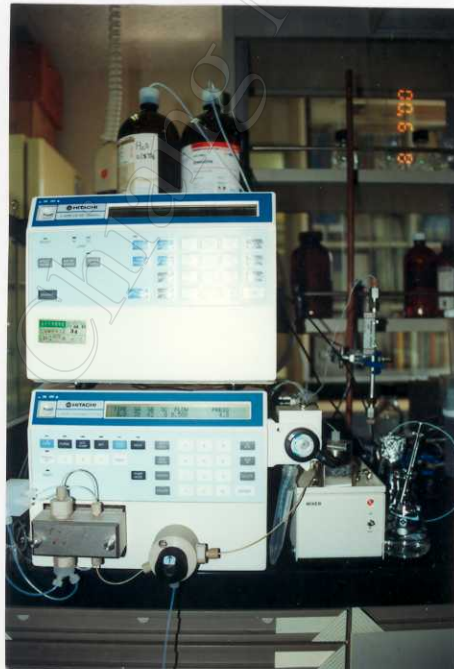
ภาพ 3 แสดง Q-sepharose HP column chromatography



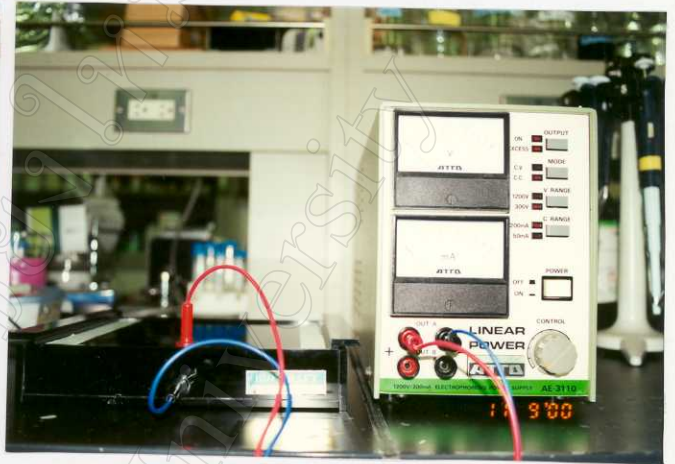
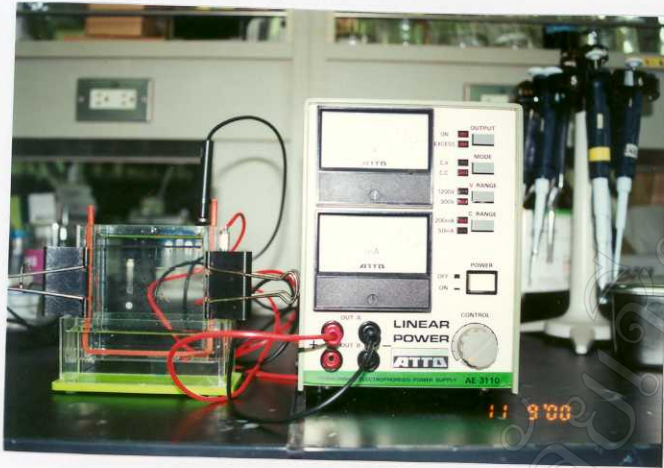
ภาพ 4 แสดง Superose 6 column chromatography



ภาพ 5 แสดง Mono Q column chromatography



ภาพ 6 แสดง C-18 HPLC (high-performance liquid chromatography)



ก

ข

ภาพ 7 ก. แสดงอุปกรณ์แยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

ข. แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Blotting



ภาพ 8 แสดงเครื่อง protein sequencer ที่ใช้ในการหาลำดับกรดอะมิโน



ภาพ 9 แสดงอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการผลิตแอนติบอดี



- G1 : ผงลำตัวของตัวหนอนมีจุดสีแดงเล็กๆ เกิดขึ้น
 G2 : ผงลำตัวของตัวหนอนเปลี่ยนเป็นสีส้ม
 G3 : ผงลำตัวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของระยะดักแด้
 G4 : สีน้ำตาลของดักแด้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
 G5 : สีน้ำตาลเปลี่ยนเป็นสีดำ

ภาพ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของตัวหนอนที่ระยะต่างๆ หลังจากได้รับ JHA

วิธีการวิจัย

การเตรียมหนอนเชื้อไฟเพื่อใช้ในการทดลอง

1. เลี้ยงหนอนเชื้อไฟในสภาพที่เหมาะสม โดยนำกระดวยชำระชบน้ำพอดมาวางไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดที่เจาะรูเรียบร้อยแล้ว แล้วนำหนอนเชื้อไฟออกจากกระบอกไม้ไผ่มาเลี้ยงไว้ในกล่อง
2. นำไปเลี้ยงไว้ในตู้บปลดเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีแสง ตลอด 24 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอย่างอีโมลิฟเพื่อใช้ในการทำ SDS-PAGE

1. เก็บอีโมลิฟจากกระดวยหนอนระยะไดอะพอสของหนอนเชื้อไฟ โดยใช้กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็กขลิบบริเวณปลายขาเทียมข้างใดข้างหนึ่ง ส่วนอีโมลิฟของคักแต้นั้นเก็บได้โดยใช้ส่วนปลายแหลมของปากคีบแทงส่วนปลายสุดของส่วนหัวของคักแต่ สำหรับตัวเต็มวัยนั้นทำได้โดยใช้กรรไกรปลายแหลมขลิบตรง abdominal segment อีโมลิฟจะไหลออกมาจากบริเวณที่ถูกตัด แล้วหยดลงบนแผ่น parafilm
2. ใช้ไมโครปิเปตดูดเอาอีโมลิฟจากตัวหนอน คักแต้และตัวเต็มวัยที่ได้ ตัวอย่างละ 40 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก
3. เติม 40 ไมโครลิตรของ PBS ที่มีส่วนประกอบของฟีนิลโซ โอยูเรีย 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture
4. นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
5. ใช้ไมโครปิเปตดูด supernatant จากตัวอย่างที่ได้ 40 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอดพลาสติกหลอดใหม่ เติม 160 ไมโครลิตรของ 2 x sample buffer แล้วผสมให้เข้ากัน
6. นำไปต้มในน้ำเคือด เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งประมาณ 10 นาที
7. นำสารละลายที่ได้เก็บไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการเตรียม SDS-PAGE

1. ประกบแผ่นแก้วเข้าด้วยกัน โดยใช้ spacer เป็นตัวกำหนดความหนาของแผ่นเจล
2. เตรียมสารละลายสำหรับ separating gel 7.5 มิลลิลิตร ซึ่งจะใช้ 8% acrylamide gel โดยผสมสาร

ต่างๆต่อไปนี้เข้าด้วยกัน คือ	30% acrylamide mix	2 มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	1.65 มิลลิลิตร
	0.75 M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 มิลลิลิตร
	10% SDS	75 ไมโครลิตร
	TEMED	6 ไมโครลิตร

จากนั้นเติม 25% ammonium persulfate (APS) 30 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว ผสมให้เข้ากัน

3. เติมสารละลายในข้อ 2 ลงไปในระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้มีความสูงห่างจากขอบบนของแผ่นแก้วประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ไมโครปิเปตค่อยๆหยดน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร ให้คลุมผิวเจลเพื่อไล่ฟองอากาศออกจากชั้นเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลและน้ำกลั่นที่คลุมผิวเจลอย่างชัดเจน
4. เตรียมสารละลายสำหรับ stacking gel 3.75 มิลลิลิตร โดยผสมสารดังต่อไปนี้เข้าด้วยกัน คือ

30% acrylamide mix	0.38 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1.5 มิลลิลิตร
0.25 M Tris-HCl, pH 6.8	1.85 มิลลิลิตร
10% SDS	38 ไมโครลิตร
TEMED	3 ไมโครลิตร

จากนั้นเติม 25% ammonium persulfate (APS) 15 ไมโครลิตร ลงในสารละลายที่เตรียมไว้แล้ว ผสมให้เข้ากัน

5. ใช้เข็มฉีดยาดูดเอาน้ำกลั่นที่อยู่ส่วนบนของ separating gel ออก แล้วเติมสารละลายของ stacking gel ที่เตรียมไว้ลงบนช่องที่เหลือส่วนบนของแผ่นแก้ว จากนั้นค่อยๆสอด comb ลงไปในชั้นของ stacking gel ที่เติมลงไป ระมัดระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในช่องของ comb จากนั้นทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 นาที
6. ผสมฮีโมลิบ์ตัวอย่างที่เตรียมไว้กับ 2 x sample buffer แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันทีในน้ำแข็ง
7. ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber ทั้งบน

และล่าง จากนั้นค่อยๆดึง comb ออกจาก stacking gel จะปรากฏช่องสำหรับใส่ตัวอย่างที่ต้องการ แยกบนเจล

8. ใช้ไมโครปิเปตดูดอีโมลิฟิเคชั่นที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 6 ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยจะใส่หนึ่งตัวอย่างต่อหนึ่งช่อง
9. ต่อขั้วบวกของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้ากับขั้วบวกของ chamber และต่อขั้วลบเข้ากับขั้วลบของ chamber ปรับกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 20 มิลลิแอมป์ จากนั้นเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
10. รอจนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงมาจนเกือบถึงปลายล่างของเจลจึงปิดสวิตช์
11. นำแผ่นแก้วออกจาก chamber แล้วนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมา เจลที่ได้ก็นำไปย้อมด้วยสี CBB หรือนำไปทำ blotting ซึ่งจะอธิบายวิธีการทำในลำดับต่อไป

การย้ายแถบโปรตีนจากเจลไปสู่ PVDF-membrane (Blotting)

1. นำ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
2. ตัด PVDF-membrane ให้มีค่านกว้างและด้านยาวมากกว่าแผ่นเจลด้านละ 1 เซนติเมตรแล้วนำมาใส่ในถาดที่มีเมทานอลอยู่ เขย่าเบาๆเป็นเวลา 1 นาที แล้วเทเมทานอลออก
3. เติม transfer buffer ลงไปในถาดที่มี PVDF-membrane เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที
4. เตรียมชุด blotter ซึ่งประกอบด้วย แผ่นก้านนิลไฟฟ้าขั้วบวก, แผ่นก้านนิลไฟฟ้าขั้วลบ และสายไฟที่มีทั้งขั้วบวกและขั้วลบ 1 ชุด
5. ตัดกระดาษกรองให้มีขนาดเท่ากับ PVDF-membrane จำนวน 6 แผ่น โดยนำ 3 แผ่นมาแช่ใน transfer buffer และอีก 3 แผ่นแช่ใน transfer buffer ที่ประกอบด้วย 0.1% SDS
6. นำกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น มาวางตรงกลางของแผ่นก้านนิลไฟฟ้าขั้วบวก แล้ววาง PVDF-membrane บนกระดาษกรองดังกล่าว จากนั้นวางแผ่นเจลที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสลงบน PVDF-membrane นำ gel folder วางเป็นกรอบของแผ่นเจลเอาไว้ และนำกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer + 0.1% SDS วางทับไว้ด้านบน จากนั้นนำแผ่นก้านนิลไฟฟ้าขั้วลบวางทับด้านบนสุด
7. ต่อขั้วบวกของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าเข้ากับแผ่นก้านนิลไฟฟ้าขั้วบวกที่อยู่ด้านล่างและต่อขั้วลบเข้ากับแผ่นก้านนิลไฟฟ้าที่อยู่ด้านบน ปรับกระแสไฟฟ้าให้คงที่ที่ 84 มิลลิแอมป์ จากนั้นเปิดสวิตช์ของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

8. นำ PVDF-membrane ที่ได้ไปย้อมด้วยสีย้อม CBB หรือแช่ในสารละลาย skim milk ซึ่งขึ้นกับการทดลองขั้นต่อไป

การทำ Western blot analysis

1. นำ PVDF-membrane ไปแช่ใน 3% skim milk ใน PBS เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที หรือ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
2. ล้าง membrane ด้วย PBS 3-4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
3. incubate ใน 1st antibody คือ anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antiserum โดยทำให้เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วนเท่ากับ 1 : 10,000
4. เขย่าเบาๆ และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. ล้าง membrane ด้วย 0.1% Tween 20 ใน PBS 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที
6. incubate ใน 2nd antibody ซึ่งคือ HRP conjugated anti-rabbit IgG โดยทำให้เจือจางใน PBS ด้วยอัตราส่วน 1 : 2,000 เขย่าเบาๆ และ incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
7. ล้าง membrane ด้วย 0.1% Tween 20 ใน PBS 5 ครั้งๆ ละ 5 นาที
8. ย้อมสี membrane โดยใช้ DAB tablet ที่ละลายใน 50mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 30% H₂O₂ โดยการย้อมจะทำในที่มืด ใช้เวลาประมาณ 15 นาที
9. เมื่อแถบโปรตีนถูกย้อมเป็นสีน้ำตาลแล้วหยุดปฏิกิริยาโดยใช้น้ำกลั่น
10. ความเข้มของแถบโปรตีนที่ได้สามารถวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม NIH image

การทดลองที่ 1

การแยกบริสุทธิ์

ในการแยกโปรตีนสะสมทั้ง 2 ชนิดออกจากกันนั้น มีขั้นตอนการแยกทั้งหมด 3 ขั้นตอน ซึ่งก่อนที่จะมีการแยกบริสุทธิ์นั้นต้องมีการเตรียมตัวอย่างฮีโมลิพส์เพื่อใช้ในการทดลอง และหาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทำให้โปรตีนแยกออกมาจาก column โดยทุกๆ ขั้นตอนของการแยกบริสุทธิ์นี้จะทำที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะอธิบายวิธีการเป็นลำดับขั้น (ภาพ 2) ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่างฮีโมลิพส์

- 1.1 เก็บฮีโมลิพส์ 40 ไมโครลิตร จากตัวหนอนระยะไคอะพอสของหนอนเชื้อไฟโดยใช้กรรไกรปลายแหลมขนาดเล็กขลิบบริเวณปลายขาเทียมข้างใดข้างหนึ่ง ฮีโมลิพส์ของหนอนจะไหลออกมาจากบริเวณที่โดนตัด แล้วหยดลงบนแผ่น parafilm
- 1.2 ใช้ไมโครปิเปตดูดฮีโมลิพส์ใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 1.3 เติมนสารละลายอิมัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ประกอบด้วยเกล็ดของฟีนิลไรโอยูเรียเพื่อป้องกันการเกิดเมลานิเซชัน (melanization) โดยอัตราส่วนของปริมาณฮีโมลิพส์ต่อแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 : 7 (70% ammonium sulfate)
- 1.4 นำตัวอย่างฮีโมลิพส์ที่ได้มาปั่นที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัด haemocytes และสิ่งเจือปนอื่นๆ
- 1.5 ใช้ไมโครปิเปตดูดเอา supernatant ออก แล้วทำการละลาย precipitate ที่ได้ใน 70% ammonium sulfate แล้วผสมให้เข้ากัน โดยใช้ vortex mixture
- 1.6 นำตัวอย่างดังกล่าวมาปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7 ใช้ไมโครปิเปตดูดเอา supernatant ที่แล้วนำส่วนของ platelet ที่ได้ไปละลายใน 30mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปผสมให้เข้ากัน
- 1.8 นำตัวอย่างที่ได้ใส่ในถุง cellophane แล้วใช้คลิปหนีบ แล้วนำไป dialyse ใน equilibration buffer (30mM Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทำให้เกิดการหมุนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer จากนั้นทำการเปลี่ยน equilibration buffer ครั้งแรกหลังจากเริ่ม dialyse ไปแล้ว 3 ชั่วโมง แล้ว dialyse ต่ออีก 1 ชั่วโมง แล้วทำการเปลี่ยนครั้งที่ 2 หลังจากนั้นทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- 1.9 ดูเอกสารละลายตัวอย่างที่ได้จากถุง cellophane มาไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 - 1.10 ใช้ไมโครปิเปตดูดเอา supernatant ทั้งหมดมาใส่ในหลอดพลาสติกอันใหม่ แล้วนำไปหาความเข้มข้นและปริมาณของโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในอีโมลิฟต์ตัวอย่างดังกล่าว โดยใช้ Bio-Rad Protein Assay Kit
2. การหาความเข้มข้นของ NaCl ที่เหมาะสมในการแยก SP1 และ SP2 ออกจาก Ion exchange chromatography (Q-Sepharose FF)
- 2.1 เตรียม 30mM Tris-HCl, pH 7.5 + 0.1M ถึง 1.0 M NaCl ความเข้มข้นละ 3 มิลลิลิตร
 - 2.2 เตรียม Q-Sepharose FF column โดยนำเจลปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ใน column ล้างเจลด้วย equilibration buffer หลายๆครั้ง
 - 2.3 เติมตัวอย่างอีโมลิฟต์ที่เตรียมได้จากข้อ 1 ประมาณ 50 ไมโครลิตร ลงใน column ที่เตรียมไว้ พอดตัวอย่างทั้งหมดซึมผ่านเข้าไปในชั้นของเจลแล้ว เติม equilibration buffer 3 มิลลิลิตร โดยเติมครั้งละ 1 มิลลิลิตร equilibration buffer ที่เติมลงไปจะไหลผ่านออกมา จึงใช้หลอดทดลองมารองรับสารละลายตัวอย่างที่ได้
 - 2.4 ทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3 แต่เพิ่มความเข้มข้นของ NaCl จากต่ำไปสูง คือ 0.1 M ถึง 1.0 M NaCl โดยทำครั้งละความเข้มข้นแล้วรองรับสารตัวอย่างที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นแยกเก็บไว้
 - 2.5 นำสารละลายที่ได้จากแต่ละความเข้มข้นมาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร แล้วเติม sample buffer 10 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละตัวอย่าง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที นำไปทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB เพื่อตรวจสอบปริมาณของโปรตีนที่ถูกละลายออกมาในแต่ละความเข้มข้น
3. การแยกขั้นที่ 1 : Q-Sepharose HP
- 3.1 ต่อชุดของ chromatography เข้าด้วยกัน ซึ่งประกอบด้วย Q-Sepharose HP column, pressure pump, adapter, UV monitor, recorder และ fraction collector (ภาพ 3)
 - 3.2 เตรียม buffer 2 ชนิด คือ buffer A : 30mM Tris-HCl, pH 7.5 เป็น equilibration buffer และ buffer B : 30mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 1.0 M NaCl เป็น elution buffer
 - 3.3 ต่อชุด buffer ทั้ง 2 ชนิดเข้ากับชุดของ chromatography จากนั้นล้าง column ด้วย buffer B ก่อนตามด้วย buffer A

- 3.4 ตั้งโปรแกรมในการ elute โปรตีนโดยใช้ buffer B เป็นตัว elution โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 0-0.4 M อัตราเร็วของการไหลของ buffer 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และกำหนดให้ fraction collector เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 นาที ดังนั้นหนึ่งตัวอย่างจะมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 3.5 ใช้กระบอกฉีดยาชุดฮีโมลิทซ์ที่ผ่านการ dialyse และหาปริมาณโปรตีนแล้วในข้อ 1 ทั้งหมด แล้วนำมาฉีดใส่ใน pressure pump หลังจากฉีดแล้วกดปุ่ม start program ทันที ตัวอย่างฮีโมลิทซ์จะถูกดันให้ไหลไปยัง column ที่จัดเตรียมไว้
- 3.6 นำข้อมูลจาก chromatogram ที่ได้มาวิเคราะห์แล้วตรวจสอบหา SP1 และ SP2 โดยทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB
- 3.7 นำ fraction ของ SP1 และ SP2 ที่ได้ไปหาปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนสะสมทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ Bio-Rad Protein Assay Kit

4. การแยกชั้นที่ 2 : Superose 6 (Gel-filtration chromatography)

- 4.1 นำ fraction ของ SP1 (fraction หมายเลข 16-18) หรือ SP2 (fraction หมายเลข 27-30) ที่ได้จากการแยกชั้นที่ 1 มาใส่ในหลอด ultracentrifuge (YM 30 membrane) จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าปริมาณของฮีโมลิทซ์ตัวอย่างที่ได้เหลืออยู่ในส่วนบนของหลอดประมาณ 0.2 มิลลิลิตร
- 4.2 ใช้ไมโครปิเปตดูดเอาฮีโมลิทซ์ตัวอย่างที่เหลืออยู่ในหลอด ultracentrifuge ออกมาใส่ในหลอดพลาสติก แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
- 4.3 เตรียม buffer 2 ชนิด คือ buffer A : 30mM Tris-HCl, pH 7.5 เป็น equilibration buffer และ buffer B : 30mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 0.2 M NaCl เป็น elution buffer
- 4.4 ต่อชุด buffer ทั้ง 2 ชนิด เข้ากับ chromatography โดยใช้ Superose 6 column (ภาพ 4)
- 4.5 ถ้าง column ด้วย buffer B ตามด้วย buffer A
- 4.6 ใช้หลอดฉีดยาชุดเอา SP1 (SP2) มาฉีดใน pressure pump จากนั้นใช้ buffer B เป็นตัว elute โปรตีนออกจาก column โดยใช้อัตราเร็ว 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
- 4.7 เมื่อปรากฏ peak เดียวขึ้นบน chromatogram ให้เก็บสารละลายที่ออกมาจาก column ทันที
- 4.8 นำสารละลายที่ได้บางส่วนไปวิเคราะห์โดยทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB
- 4.9 นำ fraction ของ SP1 และ SP2 ที่ได้ไปหาปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ Bio-Rad Protein Assay Kit

5. การแยกชั้นที่ 3 : Mono Q

- 5.1 นำ fraction ของ SP1 และ SP2 ที่ได้จาก Superose 6 มาใส่ในหลอด ultracentrifuge (YM 10 membrane) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm จนกระทั่งปริมาณของสารตัวอย่างเหลือประมาณ 0.2 มิลลิลิตร แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารดังกล่าวมาใส่ในหลอดทดลอง
- 5.2 dialyse fraction ของ SP1 และ SP2 ที่ได้โดย dialyse ใน equilibrium buffer เป็นเวลา 1 คืน
- 5.3 ต่อ Mono Q column เข้ากับชุด chromatography (ภาพ 5)
- 5.4 เตรียม buffer 2 ชนิด คือ buffer A : 30mM Tris-HCl, pH 7.5 เป็น equilibration buffer และ buffer B : 30mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 1 M NaCl เป็น elution buffer แล้วต่อ buffer ทั้งสองเข้ากับ column
- 5.5 ต่อชุด buffer ทั้ง 2 ชนิดเข้ากับชุดของ chromatography จากนั้นล้าง column ด้วย buffer B ก่อนตามด้วย buffer A
- 5.6 ตั้งโปรแกรมในการ elute โปรตีนโดยใช้ buffer B เป็นตัว elution โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นจาก 0 - 0.3 M สำหรับ SP1 และ 0 - 0.4 M NaCl สำหรับ SP2 กำหนดให้อัตราเร็วของการไหลของ buffer 1 มิลลิลิตรต่อนาที
- 5.7 ใช้กระบอกฉีดยาดูดคัสโมลิพที่ผ่านการ dialyse แล้วทั้งหมดนำมาฉีดใส่ใน pressure pump หลังจากฉีดแล้วกดปุ่ม start program ทันที ตัวอย่างคัสโมลิพจะถูกดันให้ไหลไปยัง column ที่จัดเตรียมไว้
- 5.8 เมื่อปรากฏ peak เดียวขึ้นบน chromatogram ให้เก็บสารละลายที่ออกมาจาก column ทันที
- 5.9 นำข้อมูลจาก chromatogram ที่ได้มาวิเคราะห์แล้วตรวจสอบหา SP1 และ SP2 โดยทำ SDS-PAGE แล้วย้อมด้วยสีย้อม CBB
- 5.10 นำ fraction ของ SP1 และ SP2 ที่ได้ไปหาปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนสะสมทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ Bio-Rad Protein Assay Kit
- 5.11 เก็บ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 2

การหาน้ำหนักโมเลกุลของ SP1 และ SP2

การทำ native molecular weight ของ SP1 และ SP2 นั้นใช้การคำนวณโดยเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้ Gel-filtration chromatography (Superose 6) โดยในที่นี้จะใช้โปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ thyroglobulin (670 kDa), ferritin (470 kDa), fibrinogen (341 kDa), immunoglobulin (158 kDa), albumin (67 kDa) และ cytochrome C (11.7 kDa) นำข้อมูลของ elution time ของ SP1 และ SP2 ที่ได้จาก Superose 6 มาคำนวณโดยใช้สมการ

$$y = 56.113 + -8.5246 \log (x) \quad R^2 = 0.97842$$

แล้วนำค่าที่คำนวณได้ไปเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Calibration curve เพื่อหา native molecular weight ของ SP1 และ SP2

การทดลองที่ 3

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ SP1 และ SP2

1. การหาลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal

- 1.1 นำ SP1 และ SP2 ที่ผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์แล้วมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 1.2 ทำการย้ายแถบโปรตีนจากแผ่นเจลมาสู่ PVDF-membrane โดยทำ Western blot นำ PVDF-membrane ที่ได้มาข้อมในสีย้อม CBB พร้อมกับเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 10 นาที
- 1.3 เทสีย้อมออกแล้วล้าง PVDF-membrane ด้วย 70% เอทานอล โดยเขย่าเบาๆ และเปลี่ยนเอทานอล 2-3 ครั้ง จนกระทั่งมีแถบสีฟ้าของโปรตีนปรากฏขึ้น
- 1.4 ใช้ปากคีบปลายแหลมคีบ PVDF-membrane ออกมาผึ่งให้แห้ง
- 1.5 ใช้ไบมัดโคนกรีเคาแถบโปรตีนออกมาจาก PVDF-membrane แล้วเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 1.6 นำโปรตีนที่อยู่บนแผ่น PVDF-membrane ไปหาลำดับกรดอะมิโน โดยนำไปใส่ใน Protein Sequencer (ภาพ 8)

2. การหา Partial amino acid sequence

2.1 การหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ Bromocyanide treatment (BrCN)

- 2.1.1 นำ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วชนิดละ 1,000 พิโคโมล มาใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก จากนั้นนำไปทำระเหยโดยใช้ evaporator
- 2.1.2 เตรียม 100 ไมโครลิตร ของ 70% formic acid และ 2 ไมโครลิตรของ 1.5 M BrCN แล้วเติมลงในผงโปรตีนทั้ง 2 ชนิดที่ได้ แล้วนำไป vortex
- 2.1.3 เก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2.1.4 นำมาทำระเหยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- 2.1.5 เติม 70% formic acid 100 ไมโครลิตร vortex และนำไปทำระเหย
- 2.1.6 เติม 100 ไมโครลิตรของ 10% acetonitrile ที่มี 0.1% TFA นำไปปั่นให้ตกตะกอน แล้วเก็บ supernatant ที่ได้ไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 2.1.7 นำ supernatant ดังกล่าว ไปใส่ในเครื่อง RT-HPLC แล้วเก็บสารละลายที่ออกมาจากเครื่องทันทีที่มี peak ปรากฏ
- 2.1.8 นำ fraction ที่ได้ไปหาลำดับกรดอะมิโน โดยนำไปใส่ใน Protein Sequencer

2.2 การหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ V8 protease

- 2.2.1 นำ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้ว ชนิดละ 10 ไมโครกรัม ไปทำระเหย
- 2.2.2 นำผงโปรตีนที่ได้มาละลายใน sample buffer (เฉพาะสำหรับ V8 protease) 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
- 2.2.3 เตรียม 18% acrylamide gel แล้วประกอบชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 2.2.4 ใช้ไมโครปิเปตดูดเอาสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ในช่องของเจล จากนั้นเติม V8 protease ลงในช่องเดียวกับสารตัวอย่างที่เติมลงไป โดยเติมทับลงบนสารตัวอย่าง
- 2.2.5 ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 15 มิลลิแอมป์
- 2.2.6 เมื่อสีน้ำเงินของสารตัวอย่างเคลื่อนผ่านชั้นของ stacking gel มาจนถึงชั้น separating gel หยุดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเริ่มทำอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้ง
- 2.2.7 หยุดการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเมื่อแถบสีน้ำเงินของสารตัวอย่างเคลื่อนมาถึงขอบสุดของช่องของแผ่นเจล
- 2.2.8 นำแผ่นเจลที่ได้ไปทำ blotting

- 2.2.9 นำ PVDF-membrane ไปย้อมด้วยสีย้อม CBB แล้วล้างสีย้อมออกโดยใช้ 70% เอทานอล จนกระทั่งมีแถบสีฟ้าของ โปรตีนปรากฏขึ้น
- 2.2.10 หลังจากผึ่งให้แห้งแล้ว ใช้ใบมีดโกนตัดเอาแถบโปรตีนที่เป็นแถบหลักมาเก็บไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก
- 2.2.11 นำแถบโปรตีนที่ได้ไปหาลำดับกรดอะมิโน โดยนำไปใส่ใน Protein Sequencer

2.3 การหาลำดับกรดอะมิโนโดยใช้ trypsin

- 2.3.1 นำ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วชนิดละ 1,000 พิโคโมล มาใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็ก จากนั้นนำไปทำระเหยโดยใช้ evaporator
- 2.3.2 ละลายผงโปรตีนที่ได้ใน 6 M Urea ใน 50mM Tris-HCl, pH 8.0 50 ไมโครลิตร และ 1 M DTT 0.25 ไมโครลิตร
- 2.3.3 นำไป incubate ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นวางในน้ำแข็งทันที
- 2.3.4 เติม 50mM Tris-HCl, pH 7.6 และ 1mM CaCl₂ 300 ไมโครลิตร และ trypsin ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 2.3.5 incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง
- 2.3.6 นำสารละลายที่ได้ไปใส่ในเครื่อง C-18 HPLC (ภาพ 6) แล้วเก็บสารละลายที่ออกมาจากเครื่องทันทีที่มี peak ปรากฏ
- 2.3.7 นำ fraction ที่ได้ไปหาลำดับกรดอะมิโน โดยนำไปใส่ใน Protein Sequencer

นำข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Applied Biosystem Model 476A จากนั้นนำไปเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่หาได้กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดอื่นโดยใช้โปรแกรม FASTA

การทดลองที่ 4

การสร้างแอนติบอดี

1. นำ SP1 และ SP2 ที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์แล้วชนิดละ 400 ไมโครกรัม ไปทำระเหยโดยใช้ evaporator จากนั้นละลายใน sample buffer 20 ไมโครลิตร แล้วทำอิเล็กโตรโฟรีซิส
2. ล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วย้อมเจลด้วยสีย้อม CBB ที่เตรียมโดยใช้น้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสีย้อมออกโดยใช้น้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนกระทั่งไม่มีสีน้ำเงินเหลืออยู่บนเจล นอกจากบริเวณที่เป็นแถบโปรตีน
3. ใช้ใบมีดโกนตัดเจลบริเวณที่เป็นแถบโปรตีนออกมา แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ
4. homogenized โดยใช้หลอดฉีดยา 2 หลอดที่มีหัวเชื่อมเชื่อมต่อกัน โดยดันขึ้นเจลให้ไหลผ่านรูเล็กๆของหัวเชื่อม ดันเจลไปมาระหว่างหลอดฉีดยาทั้งสองหลอด เจลจะถูกทำให้เป็นชิ้นละเอียด
5. เติม 30mM Tris-HCl, pH 7.5 ลงไปให้มีปริมาตรโดยรวมทั้งหมด 1 มิลลิลิตร
6. เติม Freund's complete adjuvant ลงไปอีก 1 มิลลิลิตร ทำให้เป็นอิมัลชัน (emulsion) โดยดันไปมาระหว่างหลอดฉีดยาทั้งสองหลอด
7. วางหลอดฉีดยาในข้อ 6 ลงในน้ำแข็ง
8. นำอิมัลชันที่ได้ไปฉีดให้แก่กระต่าย โดยฉีด SP1 ให้แก่กระต่ายตัวผู้ 1 ตัวและตัวเมีย 1 ตัว ส่วน SP2 ก็ทำเช่นเดียวกัน ในการฉีดนั้นจะฉีดลงบนหลังของกระต่ายในชั้น subcutaneous ซึ่งจะทำให้การฉีดบนหลังของกระต่ายมากกว่า 10 จุด โดยจะฉีดให้กระต่ายตัวละ 1 มิลลิลิตร
9. ทำการฉีดครั้งที่สอง หลังจากการฉีดครั้งแรก 3 อาทิตย์ ในการฉีดครั้งที่สองนี้จะใช้ Freund's incomplete adjuvant เป็นตัวทำให้เกิดอิมัลชัน ส่วนขั้นตอนอื่นนั้นทำเหมือนการฉีดครั้งแรกทุกประการ
10. ทำการเก็บเลือดของกระต่ายทั้งหมดโดยเก็บเลือดจากเส้นเลือด (Jugular vein) บริเวณคอของกระต่ายหลังจากการฉีดครั้งที่สอง 10 วัน
11. นำเลือดกระต่ายมา incubate ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไป incubate ที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน
12. นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
13. ใช้ไมโครปีเปตดูดเอาซีรัมที่ได้มาใส่ในหลอดพลาสติก แล้วเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1. การทำ titration ของ antiserum activity

หลังจากที่ได้ซีรัมแล้วนำมาทำการวัด activity ของซีรัม โดยการทำให้ antiserum activity

1.1 เตรียมตัวอย่างอีโมลิฟของระยะตัวหนอน นำมาทำ SDS-PAGE โดยกำหนดให้มีโปรตีนในแต่ละช่องๆ ละ 3 ไมโครกรัม

1.2 ทำ Western blot แล้ว incubate membrane ใน ซีรัม SP1 ที่เตรียมใน PBS ในอัตราส่วน 1 : 2,000, 1 : 4,000, 1 : 8,000, 1 : 16,000 และ 1 : 32,000 ตามลำดับ

1.3 incubate ใน second antibody ซึ่งได้แก่ anti-rabbit IgG ในอัตราส่วน 1 : 2,000

1.4 ตรวจสอบด้วย DAB

1.5 วิเคราะห์ความเข้มของแถบที่ตรวจได้ด้วยโปรแกรม NIH-image

2. การหาปริมาณโปรตีนต่ำสุดที่สามารถวัด antibody activity ได้

1.1 เตรียมตัวอย่างอีโมลิฟจากระยะตัวหนอน ให้มีปริมาณโปรตีน 100 นาโนกรัม, 10 นาโนกรัม, 1 นาโนกรัม, 0.1 นาโนกรัม และ 0.01 นาโนกรัม แล้วนำมาทำ SDS-PAGE

1.2 ทำ Western blot แล้ว incubate membrane ใน ซีรัม SP1 และ SP2 ที่เตรียมใน PBS โดยใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดี 1 : 10,000 และใช้ความเข้มข้นของ second antibody 1 : 2,000

1.3 incubate ใน second antibody ซึ่งได้แก่ anti-rabbit IgG ในอัตราส่วน 1 : 2,000

1.4 ตรวจสอบด้วย DAB

1.5 นำ membrane ไปวัดความเข้มของแถบด้วยโปรแกรม NIH-image

การทดลองที่ 5

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนสะสมในระยะต่างๆของการเจริญ

1. เก็บตัวอย่างโปรตีนจากอีโมลิฟและ fat body ของหนอนเชื้อ ฝักราชวัติ, ระยะไคอะพอสระยะคักแต่ และตัวเต็มวัย
2. นำมาทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โปรตีนบนแผ่นเจลที่ได้หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสจะถูกย้ายจากแผ่นเจลไปยัง PVDF-membrane
3. ทำ Western blot analysis

การทดลองที่ 6
การศึกษาผลของฮอร์โมนอินซูลินต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนสะสม
ในฮีโมโกลินของหนอนเยื่อไผ่ระยะต่างๆ

1. หยอดฮอร์โมนอินซูลินในความเข้มข้น 0.005 ไมโครกรัม/ 5 ไมโครลิตร ให้แก่หนอนเยื่อไผ่ระยะไคอะพอส
2. เก็บฮีโมโกลินของหนอนที่การเปลี่ยนแปลงขั้นต่างๆ (ภาพ 10) ได้แก่
 - 2 วันหลังจากได้รับฮอร์โมน
 - G0 : ตัวหนอนหยุดการเคลื่อนไหว
 - G1 : ผนังลำตัวของตัวหนอนมีจุดสีแดงเล็กๆ เกิดขึ้น
 - G2 : ผนังลำตัวของตัวหนอนเปลี่ยนเป็นสีส้ม
 - G3 : ผนังลำตัวเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของระยะคักแด่
 - G4 : สีน้ำตาลของคักแด่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
 - G5 : สีน้ำตาลเปลี่ยนเป็นสีดำ
3. นำตัวอย่างฮีโมโกลินจากแต่ละระยะมาทำ SDS-PAGE โปรตีนบนเจลถูกย้ายมาสู่ PVDF-membrane จากนั้นนำ membrane ดังกล่าวไปทำ Western blot analysis
4. ผลการทดลองที่ได้นำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NIH image

การทดลองที่ 7
การศึกษาแหล่งสังเคราะห์และหลังโปรตีนสะสมทั้งสองชนิด
โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry

1. นำ fat body ของหนอนเยื่อไผ่ระยะตัวหนอนและคักแด่มาแช่ใน Bouin's fixative ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
2. ล้าง fat body ด้วย 70% เอทานอล จนกว่าสีเหลืองของ Bouin's fixative จะหมดไป
3. นำ fat body มาทำ paraffin section บนกระจกสไลด์
4. deparaffin ด้วย xylene 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที
5. แช่ใน 100% เอทานอล และ 70% เอทานอล อย่างละ 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที

6. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3-5 ครั้ง
7. incubate เนื้อเยื่อด้วย 1st antibody คือ anti-SP1 และ anti-SP2 rabbit polyclonal antibody โดย dilute ด้วย PBS ในอัตราส่วน 1 : 1,000
8. incubate ในกล่องพลาสติกฝาปิดที่มีเยื่อกระดาษชุบน้ำจุ่ม (moistened box) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
9. ล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
10. incubate section ด้วย 2nd antibody ซึ่งได้แก่ HRP conjugated anti-rabbit IgG ที่ dilute ใน PBS ด้วยอัตราส่วน 1 : 500 จากนั้นนำไป incubate ในกล่องพลาสติกฝาปิดที่มีเยื่อกระดาษชุบน้ำจุ่ม (moistened box) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
11. ล้าง section ด้วย PBS 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
12. incubate เนื้อเยื่อใน reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย DAB tablet ละลายใน 50mM Tris-HCl, pH 7.5 และ 30% H₂O₂ เป็นเวลาประมาณ 2 นาที
13. ล้างด้วย PBS 2-3 ครั้ง
14. dehydrate เนื้อเยื่อใน 70%, 90%, 99% และ 100% เอทานอล อย่างละ 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ตามลำดับ
15. ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
16. หยด methyl salicylate บนเนื้อเยื่อแล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์